

文章编号 1006-8147(2022)02-0200-05

论著

基于开放式三明治酶联免疫分析的雌二醇检测方法的建立

王文皓¹, 闫若辰¹, 魏琳纳², 袁玉华²

(1.天津医科大学总医院检验科,天津 300052; 2.天津医科大学总医院空港医院检验科,天津 300308)

摘要 目的:通过建立开放式三明治酶联免疫分析方法(OE-ELISA),对雌二醇进行检测。方法:通过基因拼接构建质粒后在原核表达系统中制备小分子泛素相关修饰物蛋白-大肠杆菌麦芽糖结合蛋白-抗体轻链可变区(sumo-MBP-VL)和碱性磷酸酶-抗体重链可变区(ALP-VH)融合蛋白,并从产量和可溶性角度对两种蛋白的表达条件进行优化。将得到的两种蛋白纯化后分别作为包被抗体和酶标抗体,建立检测雌二醇的 OE-ELISA 方法。应用竞争 ELISA 和 OE-ELISA 测定不同浓度的雌二醇标准品,绘制标准曲线并计算两种方法的敏感性。结果:在质粒中加入 sumo 标签后,实现了 sumo-MBP-VL 融合蛋白的可溶性表达。在 Rosetta 宿主菌中 37℃ 诱导后得到大量的 ALP-VH 和 sumo-MBP-VL 融合蛋白。OE-ELISA 测定雌二醇标准品的标准曲线为 $y=0.0296x+1.3029$, $r^2=0.9961$, 敏感性为 532 pg/mL, 优于竞争 ELISA 803 pg/mL 的敏感性。结论:成功建立了检测雌二醇的 OE-ELISA 方法。

关键词 OE-ELISA; 雌二醇; 竞争 ELISA; sumo 标签

中图分类号 R392-33

文献标志码 A

Application of open sandwich ELISA on detection of estradiol

WANG Wen-hao¹, YAN Ruo-chen¹, WEI Lin-na², YUAN Yu-hua²

(1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital Airport Site, Tianjin Medical University, Tianjin 300308, China)

Abstract **Objective:** To detect estradiol by establishing open sandwich immunoassay (OE-ELISA). **Methods:** Alkaline phosphatase-heavy chain variable area (ALP-VH) and small ubiquitin-related modifier protein-maltose binding protein-light chain variable area (sumo-MBP-VL) fusion proteins were prepared in the prokaryotic expression system after gene splicing to construct the plasmid, and the expression conditions of the two proteins were optimized from the perspective of yield and solubility. The two proteins which were purified were used as coated antibodies and enzyme-conjugated antibodies to establish an OE-ELISA method for detection of estradiol. Competitive ELISA and OE-ELISA were used to determine different concentrations of estradiol standard products, and the sensitivity of the two methods was calculated by drawing standard curves. **Results:** The soluble expression of sumo-MBP-VL fusion protein was achieved by adding sumo tag to plasmid. A large number of ALP-VH and sumo-MBP-VL fusion proteins were induced at 37℃ in Rosetta host bacteria. The standard curve of OE-ELISA for determination of estradiol standard products was $y=0.0296x+1.3029$, $r^2=0.9961$, and the sensitivity was 532 pg/mL, which was better than that of competitive ELISA (803 pg/mL). **Conclusion:** An OE-ELISA for estradiol detection was successfully established.

Key words OE-ELISA; estradiol; competitive ELISA; sumo tag

雌二醇是一种类固醇激素,其结构为小分子化合物^[1]。临床检测雌二醇时由于其抗体结合位点少,多采用适合半抗原的竞争性免疫分析方法^[2-3]。竞争性酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)由于无法检测微量的抗原,所以认为其敏感性会低于非竞争性免疫分析^[4]。

开放式三明治酶联免疫分析(open sandwich ELISA, OE-ELISA)最早在 1996 年由 Ueda 等^[5]提出。本实验通过将抗体重链可变区 (heavy chain variable

area, VH) 片段与碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 连接, 抗体轻链可变区 (light chain variable area, VL) 片段与大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 和小分子泛素相关修饰物蛋白 (small ubiquitin-related modifier protein, sumo) 连接, 来建立检测雌二醇的 OE-ELISA 方法。并从检测敏感性角度对比竞争 ELISA 与 OE-ELISA。为各种抗原, 特别是分子量小于 1 000 的小分子物质进行非竞争性夹心检测奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 抗雌二醇单克隆抗体 T18 株由本实验室保存; 质粒载体 pET28a(+) 购自南京金斯瑞有限

基金项目 国家重点研发计划 (2020YFC0843100)

作者简介 王文皓 (1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学技术 (检验方向); 通信作者: 袁玉华, E-mail: yyhxxx39@sina.com。

公司;大肠杆菌 Rosetta(DE3)和 BL21(DE3)菌株购自天根生化科技(北京)有限公司;HisTrap™ HP 镍柱购自 GE Healthcare 公司;Estradiol-ALP 试剂由博奥赛斯(天津)生物科技有限公司馈赠;实验用雌二醇标准品及其他生化试剂购自索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 通过测序确定单克隆抗体 T18 株的 VH 和 VL 基因序列。在 pET28a(+)质粒载体上分别拼接 3 段序列,即:VH 序列与 ALP 序列(GenBank: AZR39392.1),VL 序列与 MBP 序列(GenBank: AHM36606.1),VL 序列、MBP 序列与 sumo 序列(GenBank: ADF45345.1)。交由南京金斯瑞生物有限公司合成基因并构建质粒。

1.2.2 ALP-VH 融合蛋白的表达 将 pET28a(+)/ALP-VH 重组质粒转化到大肠杆菌中,平板划线挑取单克隆菌落接种于 LB 培养基中。在 37℃ 下振荡培养至对数生长期后,加入 0.5 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl B-D-thiogalactoside, IPTG)诱导细菌产生蛋白。实验设置 2 种转化宿主菌:BL21(DH3)和 Rosetta (DH3);2 种不同温度:22℃ 和 37℃ 来对比 ALP-VH 融合蛋白的表达情况。在 4℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min 收集菌体,重悬于 1×PBS 中。将收集到的菌液进行超声破碎,取沉淀和上清样品,进行 SDS-PAGE 电泳,观察蛋白产量及可溶性表达情况。破碎后的菌液经离心后取上清,再通过 HisTrap™ HP 镍柱纯化。最终经 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹验证,测定蛋白浓度后,保存于-80℃ 备用。

1.2.3 sumo-MBP-VL 融合蛋白的表达 通过上述方法,初次表达 pET28a(+)/MBP-VL 重组质粒时,同样在 2 种转化宿主菌和 2 种不同温度下进行诱导,观察蛋白表达情况。在 pET28a(+)/MBP-VL 质粒上添加 sumo 序列后,再次表达,观察蛋白可溶性表达情况。收集 sumo-MBP-VL 融合蛋白后通过镍柱纯化,经 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹验证后,测定蛋白浓度,保存于-80℃ 备用。

1.2.4 竞争法检测雌二醇标准品 在 96 孔微孔板上包被羊抗鼠抗体,4℃ 过夜孵育。第 2 天,用 PBST (0.05% Tween-20 的 1×PBS)洗液在自动洗板机上洗涤微孔板。每孔添加纯化后的雌二醇抗体 T18,37℃ 孵育 1 h,再用 5%脱脂奶粉在 37℃ 孵箱中孵育 2 h 进行封闭。清洗酶标板后添加稀释过的雌二醇标准品(100、50、10、5、1、0.5、0 ng/mL)和 E2-ALP 耦联物,37℃ 反应 1 h。彻底清洗酶标板后加入 ALP 底物(PNPP)37℃ 避光显色 30 min 后,读取 405 nm 处的吸

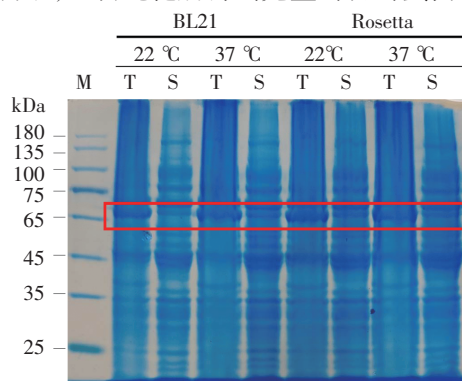
光度值。每个浓度重复测定 5 次后,以雌二醇标准品浓度为横坐标,B/B0 值为纵坐标,绘制标准曲线。计算平均值和标准差,带入曲线分析试验敏感性。

1.2.5 OE-ELISA 检测雌二醇标准品 在 96 孔板上包被 sumo-MBP-VL 融合蛋白,4℃ 过夜孵育。用 PBST 洗液清洗后,每个孔中加入 5%脱脂奶粉封闭。将雌二醇标准品分别稀释到 100、50、10、5、1、0.5、0 ng/mL 后,加入到清洗后的微孔板中。在 37℃ 孵育 1 h 后再次清洗微孔板。再加入 ALP-VH 融合蛋白,37℃ 孵育 1 h 后用 PBST 进行充分洗涤。最后加入 PNPP 显色,读取 405 nm 处的吸光度值。对每个浓度重复测定 5 次,绘制标准曲线,计算实验敏感性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS10.0 软件对数据进行处理。对计量数据进行正态性检验,其中, $\bar{x} \pm s$ 表示各浓度重复测定数据的平均值及标准差;变异系数(CV)值表述各组实验数据的变异系数。将两种方法测得的数据分别进行回归分析,绘制标准曲线,计算相关系数 r 。

2 结果

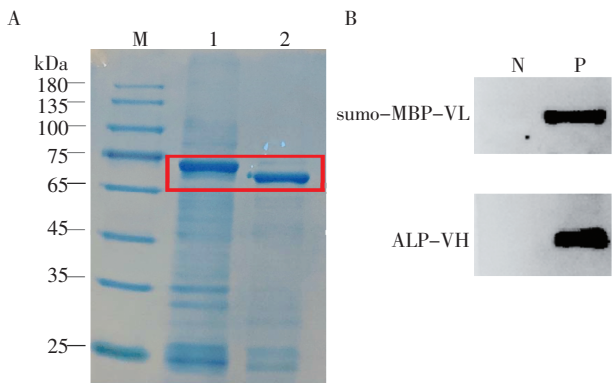
2.1 ALP-VH 融合蛋白的表达 经原核系统表达后,结果如图 1 所示,在红色方框内已标出相应目的的大小的 ALP-VH 融合蛋白。观察发现,pET28a(+)/ALP-VH 重组质粒成功在大肠杆菌菌株中表达目的蛋白。通过对比 SDS-PAGE 胶上不同诱导条件下蛋白条带深浅,观察蛋白在上清液及沉淀物中的相应含量,发现蛋白在不同菌株(BL21、Rosetta)和不同温度(22℃、37℃)下的蛋白产量无明显区别,但均可形成部分可溶性表达。最终选择 Rosetta 菌株在 37℃ 下诱导的条件进行大量表达。在 SDS-PAGE 胶上进行大小的确定,结果见图 2A 中 1 号孔内红色方框所示,得到大小约为 68 kD 的 ALP-VH 融合蛋白。用抗 HIS 抗体进行 Western 印迹检测,结果如图 2B 所示,证明纯化后得到完整的目的蛋白。



注:M:Marker;T:细菌沉淀;S:细菌上清液;ALP-VH:碱性磷酸酶-抗体重链可变区

图1 ALP-VH 融合蛋白表达

Fig 1 Expression of ALP-VH fusion protein



注:M: Marker;1:sumo-MBP-VL 融合蛋白;2:ALP-VH 融合蛋白;N:阴性对照;P:样本;sumo-MBP-VL:小分子泛素相关修饰物蛋白-大肠杆菌麦芽糖结合蛋白-抗体轻链可变区;ALP-VH:碱性磷酸酶-抗体重链可变区

图2 蛋白纯化

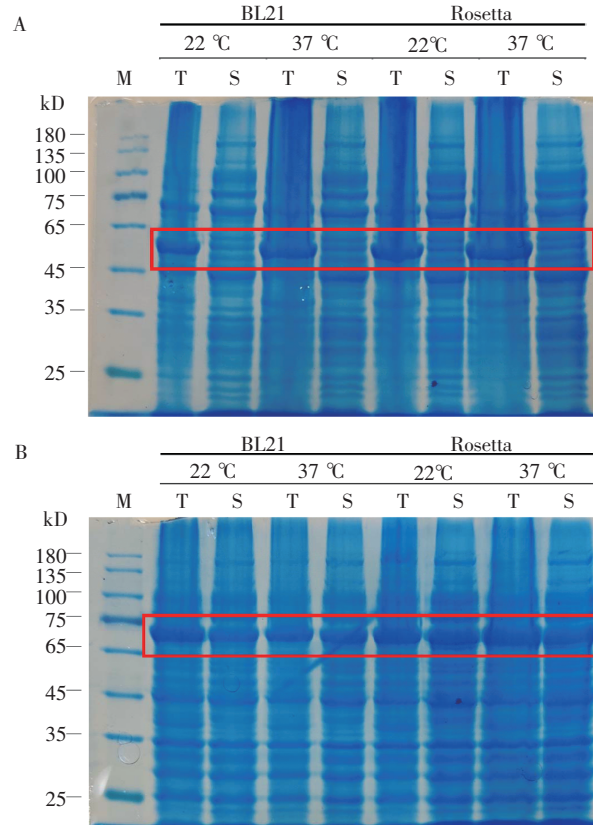
Fig 2 Protein purification

2.1 sumo-MBP-VL 融合蛋白的表达 pET28a(+)/MBP-VL 重组质粒成功在大肠杆菌菌株中表达目的蛋白。结果如图 3A 红色方框内所示,观察蛋白在上清液及沉淀物中的相应产量,认为 MBP-VL 融合蛋白在不同宿主菌(BL21、Rosetta)和不同温度(22℃、37℃)下均未形成蛋白的可溶性表达。pET28a(+)/sumo-MBP-VL 重组质粒亦在大肠杆菌中成功表达,经 SDS-PAGE 胶验证,发现通过标签的添加使得蛋白在不同宿主菌和温度下均可形成可溶性表达,结果如图 3B 红色方框内所示。根据实验结果,选择 Rosetta 菌株在 37℃下进行诱导的条件,制备最大产量的 sumo-MBP-VL 融合蛋白。将纯化后蛋白经 SDS-PAGE 胶和 Western 印迹验证,结果见图 2A 中 2 号孔内红色方框和图 2B 所示,得到大小约为 70 kD 的 sumo-MBP-VL 融合蛋白。

2.3 竞争法检测雌二醇标准曲线的绘制 竞争 ELISA 测定雌二醇标准品得到的标准曲线如图 4A 所示。当标准品浓度较高时,游离的雌二醇标准品与 E2-ALP 在体系内竞争抗体结合位点,导致与微孔板结合的 E2-ALP 减少,吸光度降低,曲线呈现负相关。重复测定的各浓度标准品的平均值、标准差及 CV 已由表 1 列出。通过 CV 值可以看出实验重复性良好。根据曲线相关系数 r^2 为 0.961,说明曲线相关性良好。代入数据得到竞争 ELISA 最低检出限为 803 pg/mL。

2.4 OE-ELISA 检测雌二醇标准曲线的绘制 OE-ELISA 测定雌二醇标准品得到的标准曲线如图 4B 所示。酶标板上成功包被了 VL 有效片段对雌二醇进行吸附,雌二醇再与 VH 有效片段结合,最后经 ALP 和底物反应进行显色,完成测定。根据各孔 OD405 值,绘制标准曲线。通过曲线可知,标准品与两种融合蛋白形成了良好的结合,且反应呈线性。根据表 1 列

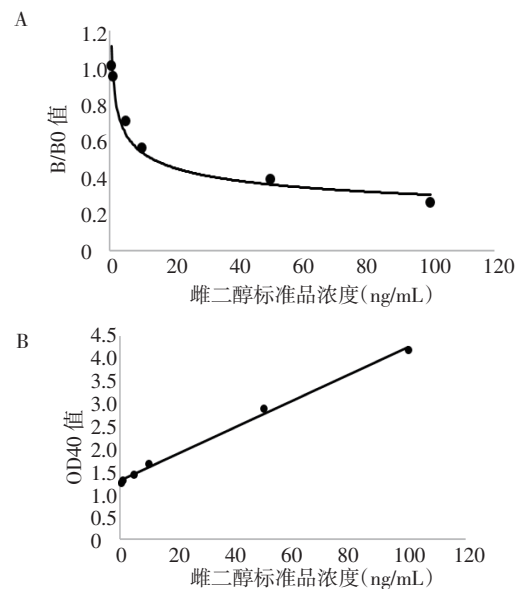
出的各浓度标准品的平均值及标准差数据可得 OE-ELISA 的回归方程为: $y=0.029\ 6x+1.302\ 9$, $r^2=0.996\ 1$ 。各组重复数据通过表 1 中 CV 值可以看出实验重复性良好。计算此方法敏感性,可以达到 532 pg/mL。



注:M: Marker; T:细菌沉淀; S:细菌上清液; A:未添加 sumo 标签; B:添加 sumo 标签;MBP-VL:大肠杆菌麦芽糖结合蛋白-抗体轻链可变区

图3 MBP-VL 融合蛋白表达

Fig 3 Expression of MBP-VL fusion protein



注:A:竞争性 ELISA; B:OE-ELISA;OE-ELISA:开放式三明治酶联免疫分析

图4 雌二醇测定标准曲线

Fig 4 Standard curve for the determination of estradiol

表1 两种方法检测雌二醇标准品的吸光度值($\bar{x} \pm s$)及变异系数(CV)
Tab 1 Absorbance values($\bar{x} \pm s$) and variable coefficient (CV) of estradiol standard samples measured by two methods

标准品浓度 (ng/mL)	OE-ELISA	CV (%)	竞争 ELISA	CV (%)
100	4.201±0.023	0.55	1.129±0.021	1.86
50	2.889±0.024	0.83	1.686±0.021	1.25
10	1.674±0.017	1.02	2.416±0.021	0.87
5	1.425±0.087	6.11	3.030±0.020	0.66
1	1.304±0.013	1.07	4.071±0.023	0.56
0.5	1.248±0.010	0.80	4.321±0.024	0.56
0	1.108±0.009	0.81	4.282±0.008	0.19

3 讨论

雌二醇是女性体内重要的内源性雌激素^[6],临床经常用于辅助评价女性卵巢功能^[7]。对于临床常用的竞争法检测,其测定雌二醇时,需同时放入标记和未标记(待测样本)的抗原来竞争包被抗体,被分析物的浓度与显色程度成反比^[8](图 5A)。由于其需要包被有限的抗体来确保两种抗原形成竞争关系,使得微量的待测抗原无法有效地被检测到。笔者应用 OE-ELISA 来改善雌二醇的检测方法。此方法的原理是利用固定化 VL 片段和可被检测的 VH 片段,来对抗原进行夹心测定。与双抗体夹心检测方法不同,此方法只需要一种抗体,规避了半抗原难以制备多个单克隆抗体的问题^[9]。OE-ELISA 自提出后,已被用于瘦肉精等多种物质的检测^[10-11]。本实验将 VH 片段与 ALP 连接,VL 片段与 MBP 和 sumo 标签连接,来建立检测雌二醇的 OE-ELISA 方法(图 5B)。

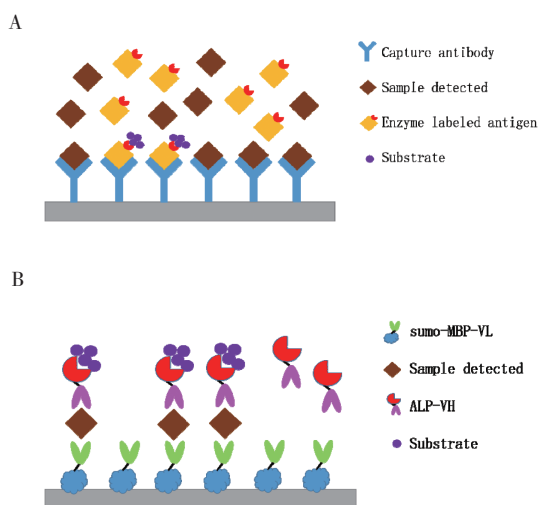
HRP)相比,得到的实验结果更稳定和准确^[12],所以选择其作为 VH 片段的连接物。ALP-VH 融合蛋白可以直接被检测,缩短了检测所用的时间。并且 VH 与 ALP 的融合表达,不仅节约时间和成本,而且避免了抗体片段在标记过程中失活^[13-15]。为了满足 VL 片段的顺利表达,笔者选择 MBP 和 sumo 蛋白作为其融合伙伴。其中 MBP 在实验中被证实可以提高蛋白的产量^[16-18],sumo 标签被证实可以促进蛋白的可溶性表达^[19-20]。在本实验中,通过添加 sumo 标签,改善了 Lim 等^[21]建立 OE-ELISA 时所用的 MBP-VL 融合蛋白,实现了包被片段的可溶性表达。添加的 MBP 和 sumo 蛋白在本实验中也起到与酶标板结合的作用,使得 VL 片段的抗原结合位点充分暴露,便于其后续与抗原更有效地结合。

在原核表达的宿主菌和温度的选择上,Rosetta 菌株被证实适宜应用在具有 T7 启动子和稀有密码子的融合基因序列的表达中^[22]。实验结果显示,在 Rosetta 菌株中 37℃ 下进行诱导得到的 sumo-MBP-VL 融合蛋白的产量最佳。

本实验基于 sumo-MBP-VL 和 ALP-VH 融合蛋白成功建立了 OE-ELISA 方法。在测定雌二醇时,该方法比竞争 ELISA 在分析敏感性上提高了约 1.5 倍。OE-ELISA 方法的建立不仅为雌二醇检测方法的研究奠定了基础,也为其他半抗原的检测提供了新的思路。

参考文献:

- [1] ZINN S, SCHNELL M. Flexibility at the fringes: conformations of the steroid hormone β -estradiol[J]. Chemphyschem, 2018, 19(21): 2915-2920.
- [2] DU P, JIN M, CHEN G, et al. A competitive bio-barcode amplification immunoassay for small molecules based on nanoparticles[J]. Sci Rep, 2016, 6: 38114.
- [3] LIN W Z, CHEN Y H, LIANG C K, et al. A competitive immunoassay for biotin detection using magnetic beads and gold nanoparticle probes[J]. Food Chem, 2019, 271: 440-444.
- [4] KOBAYASHI N, GOTO J. Noncompetitive immunoassays for small molecules with high sensitivity and specificity[J]. Adv Clin Chem, 2001, 36: 139-170.
- [5] UEDA H, TSUMOTO K, KUBOTA K, et al. Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(13): 1714-1718.
- [6] GEA M, TOSO A, SCHILIRÒ T. Estrogenic activity of biological samples as a biomarker[J]. Sci Total Environ, 2020, 740: 140050.
- [7] KETHA H, GIRTMAN A, SINGH R J. Estradiol assays—the path ahead[J]. Steroids, 2015, 99(Pt A): 39-44.
- [8] AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA[J]. Peptides, 2015, 72: 4-15.



注:A: 竞争性 ELISA 检测雌二醇;B: OE-ELISA 检测雌二醇;
OE-ELISA: 开放式三明治酶联免疫分析

图5 雌二醇免疫分析检测原理

Fig 5 Principle of estradiol immunoassay

在与抗体片段融合的蛋白的选择上,由于 ALP 与常用的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,

- [9] WEN K, BAI Y, WEI Y, et al. Influence of small molecular property on antibody response[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(39): 10944–10950.
- [10] LIANG Y, WANG Y, WANG F, et al. An enhanced open sandwich immunoassay by molecular evolution for noncompetitive detection of alternaria mycotoxin tenuazonic acid [J]. Food Chem, 2021, 361: 130103.
- [11] CONG Y, DONG H, WEI X, et al. A novel murine antibody and an open sandwich immunoassay for the detection of clenbuterol [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 182: 109473.
- [12] KUMARI G L, DHIR R N. Comparative studies with penicillinase, horseradish peroxidase, and alkaline phosphatase as enzyme labels in developing enzyme immunoassay of cortisol [J]. J Immunoassay Immunochem, 2003, 24(2): 173–190.
- [13] XIAO Q, ZHENG Y, LIU J, et al. Enzyme–antibody dual–film modified gold nanoparticle probe for ultrasensitive detection of alpha fetoprotein [J]. Biologicals, 2017, 47: 46–51.
- [14] CHI L, XU C, LI S, et al. In situ amplified QCM immunoassay for carcinoembryonic antigen with colorectal cancer using horseradish peroxidase nanospheres and enzymatic biocatalytic precipitation [J]. Analyst, 2020, 145(18): 6111–6118.
- [15] SUN J, NING X, CUI L, et al. Assembly of "carrier free" enzymatic nano–reporters for improved ELISA [J]. Analyst, 2020, 145(20): 6541–6548.
- [16] REUTEN R, NIKODEMUS D, OLIVEIRA M, et al. Maltose–binding protein (MBP), a secretion–enhancing tag for mammalian protein expression systems [J]. PloS One, 2016, 11(3): e0152386.
- [17] RARAN K S, WAUGH D. Expression and purification of recombinant proteins in *escherichia coli* with a his or dual his–MBP Tag [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1607: 1–15.
- [18] HAN Y, GUO W, SU B, et al. High–level expression of soluble recombinant proteins in *escherichia coli* using an HE–maltotriose–binding protein fusion tag [J]. Protein Expr Purif, 2018, 142: 25–31.
- [19] KIM D S, KIM S W, SONG J M, et al. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using sumo fusion tag [J]. BMC Biotechnol, 2019, 19(1): 13.
- [20] HANIF M U, YASEEN A, GUL R, et al. Small ubiquitin–like modifier protein 3 enhances the solubilization of human bone morphogenetic protein 2 in *E. coli* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2018, 186(1): 256–270.
- [21] LIM S L, ICHINOSE H, SHINODA T, et al. Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay [J]. Anal Chem, 2007, 79(16): 6193–6200.
- [22] SEPEHRIFAR H R, PILEHCHIAN L R, ATAIE S, et al. Evaluation and comparison of clostridium epsilon–alpha fusion gene expression using different commercial expression vector [J]. Arch Razi Inst, 2021, 76(1): 7–16.

(2021–09–01 收稿)

(上接第 172 页)

- and 2014 [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2018, 29(1): 78–83.
- [3] 申昆玲, 刘传合, 赵京, 等. 儿童过敏性疾病规范化培训教程 [M]. 人民卫生出版社, 2021: 157–158.
- [4] 徐敬, 王笑秋, 李文秀, 等. 上海市杨浦区两个社区儿童过敏性疾病的横断面调查与分析 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(9): 715–719.
- [5] 郑岚, 杨茜, 王星. 上海地区 2437 例食物不耐受患儿过敏原谱检测分析 [J]. 检验医学, 2018, 33(9): 786–789.
- [6] 樊茂. 昆明地区 6396 例儿童过敏原特异性 IgE 检测分析及临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(8): 1354–1358.
- [7] 郑力胜, 李会强, 张嘉懿, 等. 儿童 20556 例食物过敏原与 19453 例吸入过敏原定量检测及流行特征分析 [J]. 重庆医学, 2021, 50(13): 2203–2207.
- [8] 纪存委, 黄彦龙, 陈柳青, 等. 广州市儿童常见过敏性疾病的过敏原检测结果分析 [J]. 公共卫生与预防医学, 2021, 32(2): 81–84.
- [9] SANDRA A, MAGNUS P B, WHITNEY B, et al. Association of clinical reactivity with sensitization to allergen components in multifood–allergic children [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2017, 5: 1325–1334.
- [10] 李文瑞, 何月敬, 叶敏南, 等. 东莞市过敏患者血清过敏原特异性 IgE 检测及其年龄分布 [J]. 广东医科大学学报, 2021, 39(1): 77–80.
- [11] CHEN M H, SU T P, CHEN Y S, et al. Is atopy in early childhood a risk factor for ADHD and ASD? A longitudinal study [J]. J Psychosom Res, 2014, 77(4): 316–321.
- [12] 中华医学会儿科学分会呼吸学组哮喘协作组. 中国儿童过敏原检测临床应用专家共识 (2021 版) [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(6): 405–409.
- [13] 赵京. 正确诊断和管理儿童过敏性疾病 [J]. 中国医刊, 2020, 55(10): 1045–1048.

(2021–09–21 收稿)